

## 肝乐颗粒对肝纤维化大鼠的保护作用

姜辉, 尚莉丽, 徐松龄, 王欢  
(安徽中医学院第一附属医院, 合肥 230031)

**[摘要]** 目的: 观察肝乐颗粒(Ganle Keli, GL)对肝纤维化大鼠的保护作用。方法: 除正常组外, 其余各组采用四氯化碳诱导肝纤维化模型, 每周 2 次, 连续 12 周。于造模第 7 周起, 给药组分别 ig 给予相应的受试药物, 正常组和模型组给予等量溶媒, 疗程 6 周。实验结束后, 股动脉采血, 比色法测定血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)和肝匀浆中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)活性、羟脯氨酸(Hyp)含量; 同时取固定部位肝脏组织, HE 染色; 免疫组化技术测定肝组织中核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)蛋白的表达, RT-PCR 技术测定肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) mRNA 的表达。结果: 肝乐颗粒 1.5, 3, 6 g·kg<sup>-1</sup> 各剂量组能明显降低肝纤维化大鼠 ALT, AST, MDA, Hyp 含量, 升高 SOD 水平; 减轻大鼠肝纤维化增生程度的同时抑制肝组织中 NF- $\kappa$ B 蛋白和 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达。结论: 肝乐颗粒对 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化大鼠有很好的保护作用。

**[关键词]** 肝乐颗粒; 肝纤维化; 脂质过氧化; 细胞因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0167-04

## Protection of Ganle Keli on Liver Fibrosis in Rat

JIANG Hui, SHANG Li-li, XU Song-ling, WANG Huan

(The First Affiliated Hospital of Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the protection of Ganle Keli (GL) on liver fibrosis in rats. **Method:** Rat liver fibrosis was induced by CCl<sub>4</sub> twice a week for 12 weeks. GL was used daily via lavage starting from the 7<sup>th</sup> week of CCl<sub>4</sub> application. Contents of ALT, AST, MDA, SOD and Hyp were determinate by chromatometry. Liver samples were collected after experiments, stained by HE and immunohistochemistry of NF- $\kappa$ B. Moreover TNF- $\alpha$  mRNA expression in liver tissue was detected by RT-PCR technology. **Result:** GL could significantly reduce ALT, AST and MDA contents, increase the level of SOD. Meanwhile GL could effectively prevent the expression of NF- $\kappa$ B and the degree of hepatic fibrosis, and significantly reduce TNF- $\alpha$  mRNA in rats with liver fibrosis. **Conclusion:** GL has protective effect on liver fibrosis.

**[Key words]** Ganle Keli; liver fibrosis; lipid peroxidation; cytokine

肝纤维化是慢性肝病的共同病理学基础, 也是肝硬化发生的前奏和必经中间环节, 研究表明肝纤维化完全有逆转的可能<sup>[1-2]</sup>。如何延缓、阻断甚至逆转肝纤维化, 中医药具有独特的优势。本研究通过复制 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化模型, 拟对名老中医经验方肝乐颗粒抗肝纤维化作用进行观察, 并对其

机制进行初步探讨。

### 1 材料

**1.1 药物** 肝乐颗粒, 由柴胡、黄芪、薏苡仁、白芍、白术、猪苓、茯苓、泽兰、板蓝根组成。安徽中医学院第一附属医院院内制剂。药材饮片加水煎煮提取 3 次。第 1 次加 10 倍量水, 煎煮 1.5 h。第 2, 3 次加 8 倍量水, 煎煮 1.0 h。合并提取液滤过, 静置沉淀 48 h。吸取上清液, 减压浓缩至比重为 1.15 的流浸膏, 加入糊精作底料, 喷雾干燥制粒而成。秋水仙碱, 西双版纳药业有限责任公司。

**1.2 试剂** 四氯化碳(CCl<sub>4</sub>), 汕头市西陇化工厂,

**[收稿日期]** 20100224(003)

**[基金项目]** 安徽中医学院临床科研基金(2010LC-025A)

**[第一作者]** 姜辉, 硕士, 药师, 从事中药药理研究, Tel: 0551-2838553, E-mail: jhanbing@163.com

天冬氨酸转氨酶 (AST) 试剂盒、丙氨酸转氨酶 (ALT) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒、羟脯氨酸 (Hyp) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 兔抗鼠核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 单克隆抗体、DAB 显色试剂, 河北博海生物工程开发有限公司分装美国 Santacruz 公司; Reverse Transcription System 逆转录试剂盒、PCR 试剂盒, Fermentas 公司。

**1.3 动物** SD 大鼠, 雄性, 体重 180 ~ 220 g, 由南京医科大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (苏)2008-0004。

**1.4 仪器** GL-20A 全自动冷冻高速离心机, 湖南仪器仪表总厂离心机厂; 8453E 紫外分光光度计, 美国安捷伦公司; 电子显微镜 XDS-1B, 重庆光电仪器总公司; Hema18R 冷冻离心机、压缩机制冷式基因扩增仪、GSG2000 核酸/蛋白凝胶图像分析管理系统, 珠海黑马医学仪器有限公司。

## 2 方法

**2.1 模型制备与给药** 大鼠适应性饲养 7 d 后, 随机分为正常对照组、模型组、肝乐颗粒低、中、高剂量 (1.5, 3, 6 g·kg<sup>-1</sup>) 组和阳性药秋水仙碱 (0.1 × 10<sup>-3</sup> g·kg<sup>-1</sup>) 组, 共 6 组, 每组 10 只。除正常对照组外, 其余各组分别于大鼠背部 sc 50% CCl<sub>4</sub> (0.01 mL·g<sup>-1</sup>), 每周 2 次, 连续 12 周。第 7 周, 各给药组分别 ig 给予相应的药物, 正常组、模型组给予等量溶媒, 每天 1 次, 连续 6 周。末次给药后, 禁食 8 h 处死动物, 取相应标本待测。

**2.2 血清 ALT, AST 测定** 常规分离血清, 测定 ALT, AST 含量, 具体操作按说明书进行。

**2.3 肝组织 MDA, SOD, Hyp 含量测定** 在肝脏同一部位准确称取 0.3 g, 按说明书进行 MDA, SOD, Hyp 含量测定。

**2.4 肝组织病理学检查** 取固定部位肝组织置于 10% 的甲醛溶液中, 常规石蜡切片, HE 染色, 光镜下观察肝组织损伤程度。

**2.5 免疫组化测定肝脏 NF- $\kappa$ B p65 的表达**<sup>[3]</sup> 采用 S-P 法免疫组织化学染色, 具体操作按试剂盒说明书进行。免疫组化评分方法见参考文献[3], 结合阳性细胞百分比及阳性细胞染色强弱两个方面评分: a 为阳性细胞百分比, b 为阳性细胞染色强弱, a, b 两项乘积即为该例组织的 IHS。

**2.6 RT-PCR 测定肝组织 TNF- $\alpha$  mRNA 表达** 采用 TRIzol 法抽提 RNA, 合成第一链 cDNA。TNF- $\alpha$

Forward: 5'-CTAGTACCGAGATGTGGAAGTGGC-3'; Reverse: 5'-CTGGCTCAGCCACTCCAGC-3'。扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 40 s, 58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 33 个循环, 再 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。同法扩增  $\beta$ -action。以 5  $\mu$ L PCR 产物在凝胶上电泳, 摄像, 存入计算机, 并作图像分析。

**2.7 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析。P < 0.05 有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 肝乐颗粒对肝纤维化大鼠血清 ALT, AST 活性的影响** 与正常组比较, 模型组大鼠血清 ALT, AST 水平均显著升高; 与模型组比较, 肝乐颗粒干预 6 周后大鼠血清 ALT, AST 水平均明显降低, 结果见表 1。

表 1 肝乐颗粒对肝纤维化大鼠血清 ALT, AST 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ ) U·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ALT	AST
正常	-	29.46 ± 10.07 <sup>2)</sup>	47.42 ± 10.86 <sup>2)</sup>
模型	-	93.28 ± 14.69	131.76 ± 12.32
肝乐颗粒	1.5	74.22 ± 21.76 <sup>1)</sup>	115.47 ± 17.97 <sup>1)</sup>
	3	70.79 ± 24.54 <sup>2)</sup>	117.10 ± 14.46 <sup>1)</sup>
	6	55.01 ± 17.30 <sup>2)</sup>	104.20 ± 11.57 <sup>2)</sup>
秋水仙碱	0.1 × 10 <sup>-3</sup>	48.02 ± 10.69 <sup>2)</sup>	99.35 ± 16.67 <sup>2)</sup>

注: 与模型组比较<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01 (表 2 ~ 3 同)。

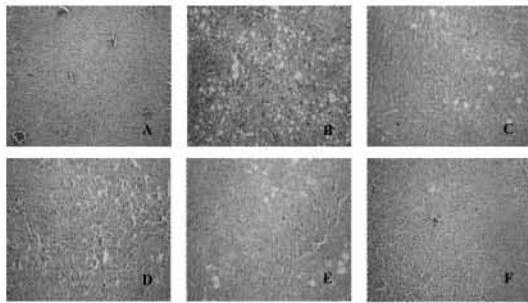
**3.2 肝乐颗粒对肝纤维化大鼠病理组织学改变的影响** HE 染色正常组肝小叶结构清晰, 肝索排列规则有序, 无胶原纤维增生; 模型组中有较多的成纤维细胞出现, 肝索排列紊乱, 纤维结缔组织增生, 肝组织中有大量空泡形成; 肝乐颗粒 3 个剂量组和秋水仙碱组肝组织损伤程度呈现好转趋势。见图 1。

**3.3 肝乐颗粒对肝纤维化大鼠肝匀浆 MDA, SOD, Hyp 的影响** 与正常组比较, 模型组大鼠肝匀浆 MDA, Hyp 水平均显著升高, SOD 水平显著下降; 与模型组比较, 肝乐颗粒低、中、高剂量组能显著降低肝纤维化大鼠 MDA, Hyp 水平, 升高 SOD 水平。结果见表 2。

**3.4 肝乐颗粒对肝组织中 NF- $\kappa$ B p65 表达的影响** 与正常组相比, 模型组大鼠 NF- $\kappa$ B 在肝胞浆和胞核广泛大量表达; 与模型组相比, 肝乐颗粒低、中、高各剂量组大鼠肝组织 NF- $\kappa$ B 表达量明显下降。IHS 评分结果见表 3。

表2 肝乐颗粒对肝纤维化大鼠肝匀浆 MDA, SOD, Hyp 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	Hyp/ $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$
正常	-	$7.52 \pm 2.26^{2)}$	$137.21 \pm 25.48^{2)}$	$192.40 \pm 25.68^{2)}$
模型	-	$13.80 \pm 3.30$	$70.32 \pm 13.48$	$272.22 \pm 37.67$
肝乐颗粒	1.5	$10.26 \pm 3.67^{1)}$	$90.33 \pm 20.87^{1)}$	$236.71 \pm 41.27^{1)}$
	3	$10.37 \pm 2.84^{1)}$	$90.19 \pm 17.40^{1)}$	$246.71 \pm 46.49^{1)}$
	6	$9.84 \pm 3.99^{2)}$	$94.29 \pm 17.38^{1)}$	$230.31 \pm 29.72^{2)}$
秋水仙碱	$0.1 \times 10^{-3}$	$10.61 \pm 2.75^{1)}$	$93.21 \pm 23.13^{1)}$	$231.14 \pm 38.48^{2)}$

图1 肝乐颗粒对肝纤维化大鼠病理组织学改变的影响 (HE,  $\times 200$ )

A. 正常组; B. 模型组; C. 肝乐颗粒  $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组;  
D. 肝乐颗粒  $3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; E. 肝乐颗粒  $6.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组;  
F. 秋水仙碱  $0.1 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组

表3 肝乐颗粒对肝纤维化大鼠肝组织中 NF- $\kappa$ Bp65 表达影响的 IHS 评分 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IHS
正常	-	$2.00 \pm 1.10^{2)}$
模型	-	$7.60 \pm 2.37$
肝乐颗粒	1.5	$5.90 \pm 1.37^{1)}$
	3	$5.80 \pm 1.93^{1)}$
	6	$5.10 \pm 1.67^{2)}$
秋水仙碱	$0.1 \times 10^{-3}$	$5.70 \pm 1.94^{1)}$

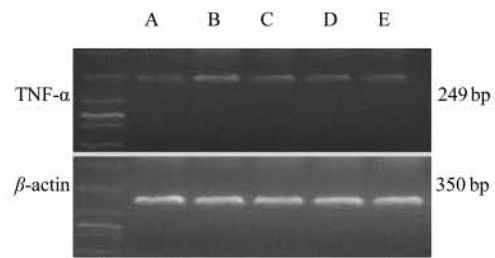
### 3.5 肝乐颗粒对肝组织 TNF- $\alpha$ mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果分析显示,肝纤维化模型组肝脏 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达显著高于正常对照组,而肝乐颗粒干预组 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达显著下降,结果见图 2。

## 4 讨论

肝乐颗粒为我院用于治疗急慢性肝炎,肝纤维化,肝硬化活动期,肝炎病毒携带者的经验方,具有疏肝理脾,活血解毒,兼以扶正、利胆、退黄之功效,在长期的临床实践中显示出很好的疗效<sup>[4-5]</sup>。

$\text{CCl}_4$  诱导的肝纤维化动物模型,其病理改变与人类肝纤维化的形态特征相似,故广泛用于防治肝纤

图2 肝乐颗粒对肝纤维化大鼠肝组织中 TNF- $\alpha$  mRNA 表达的影响

A. 正常组; B. 模型组; C. 肝乐颗粒 ( $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组;  
D. 肝乐颗粒 ( $3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组; E. 肝乐颗粒 ( $6.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组  
维化药物的筛选<sup>[6]</sup>。研究发现,在第 12 周末时,模型组肝组织有较多的成纤维细胞出现,肝索排列紊乱,纤维结缔组织增生,大量空泡形成,提示大鼠肝纤维化模型复制成功。肝乐颗粒干预 6 周后,血清 ALT, AST, MDA, Hyp 含量明显降低, SOD 水平明显升高;肝组织损伤程度呈好转趋势,提示肝乐颗粒有较好的保护肝细胞、改善肝功能的作用,其机制可能与抗机体脂质过氧化有关。

NF- $\kappa$ B 在肝纤维化时增强活性,可导致持续的炎症反应,使炎症细胞因子不断诱导中性粒细胞浸润损伤正常的肝细胞,加重肝损伤和纤维化程度;可释放 TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1 等多种炎症细胞因子,加重炎症反应,正反馈放大炎症反应<sup>[7-8]</sup>。其中 TNF- $\alpha$  在肝纤维化中的作用包括诱发急性炎症过程,增强 HSC 的趋化性,刺激间质细胞有丝分裂及诱发蛋白多糖的合成等<sup>[9]</sup>。本研究发现,肝乐颗粒能明显降低 NF- $\kappa$ B 在肝纤维化大鼠肝脏中的表达,同时抑制肝纤维化大鼠肝组织中 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达,提示肝乐颗粒可以减少体内促肝纤维化的某些细胞因子的产生。

综上,肝乐颗粒对  $\text{CCl}_4$  诱导的大鼠肝纤维化有很好的保护作用,其机制可能与抗机体脂质过氧化、抑制促炎因子的产生有关。

## 香连丸有效部位对小鼠急性溃疡性结肠炎的治疗作用

张文新, 谭晓梅\*, 胡元利, 王新雨

(南方医科大学中医药学院广东省中药制剂重点实验室, 广州 510515)

**[摘要]** 目的: 研究香连丸有效部位对葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)和 20% 乙醇联合诱导小鼠急性期溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的治疗作用。方法: 建立 DSS 和 20% 乙醇联合诱导的小鼠急性期 UC 模型, ig 给予香连丸有效部位(0.292, 0.584, 1.168 g·kg<sup>-1</sup>), 观察各组小鼠的一般状态、疾病活动指数、结肠性状、结肠组织病理学变化, 进行疾病活动指数评分(disease activity index, DAI)、测定各鼠结肠长度质量比、脾脏系数、血清中丙二醛(MDA)的含量。结果: 香连丸有效部位能显著改善结肠炎小鼠的一般状态, 改善结肠的性状, 减轻其结肠组织病理学损伤, 降低其血清中 MDA 的含量。结论: 香连丸有效部位对小鼠溃疡性结肠炎有较好的治疗作用。

**[关键词]** 香连丸有效部位; 黄连; 木香; 溃疡性结肠炎

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0170-04

### Effect of Effective Fraction of Xianglian Pill on Acute Ulcerative Colitis in Mice

ZHANG Wen-xin, TAN Xiao-mei\*, HU Yuan-li, WANG Xin-yu

(Key Research Laboratory of New Traditional Chinese Drugs, School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the therapeutic effects of effective fraction of Xianglian Pill on acute

**[收稿日期]** 20101130(001)

**[第一作者]** 张文新, 硕士研究生, 从事中药新药制剂的研究, Tel: 13286834552, E-mail: zwx1348@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 谭晓梅, 研究员, 中药学博士, 从事中药新制剂的研究, Tel: 020-61648265, E-mail: txm@fimmu.com

#### [参考文献]

- [1] Lamireau T, Desmouliere A, Bioulac-Sage P, et al. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. Arch Pediatr, 2002, 21 (2): 392.
- [2] Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, et al. Reversibility of hepatic fibrosis; from the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery [J]. Keio J Med, 2001, 50 (1): 58.
- [3] Oslow R A, Dannenberg A J, Rush D, et al. Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors [J]. Cancer, 2000, 89 (12): 2637.
- [4] 曹承楼, 杨素霞, 张国梁, 等. 肝乐冲剂治疗慢性病毒性肝炎肝郁脾虚证疗效观察 [J]. 河南中医, 2007, 27 (10): 28.
- [5] 杨小军, 张国梁, 施卫兵. 肝乐冲剂治疗乙型肝炎肝郁脾虚型 60 例临床观察 [J]. 浙江中医药大学学报, 2010, 34 (3): 353.
- [6] 陈飞虎, 袁丽萍, 钟明媚, 等. 鬼针草总黄酮抗大鼠肝纤维化的实验研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11 (12): 1369.
- [7] 胡泰洪, 蒋祥虎, 蒋跃明, 等. 肝纤维化大鼠肝组织中 NF- $\kappa$ B 及 ERK-mRNA 的表达 [J]. 临床肝胆病杂志, 2009, 25 (1): 23.
- [8] 张久聪, 聂青和. 核因子- $\kappa$ B 与肝纤维化分子调控 [J]. 实用肝脏病杂志, 2009, 1 (12): 63.
- [9] 袁丽萍, 陈飞虎, 夏丽娟, 等. 鬼针草总黄酮对肝纤维化大鼠细胞因子的影响 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23 (7): 987.

[责任编辑 聂淑琴]